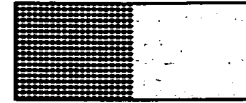




Issue Number : 5-5-2009-070074414



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

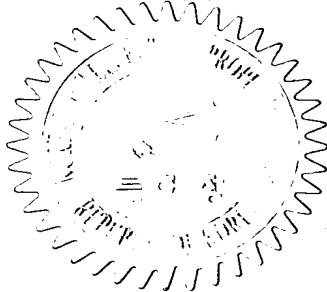
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2004-0001974
Application Number

출원년월일 : 2004년 01월 12일
Filing Date JAN 12, 2004

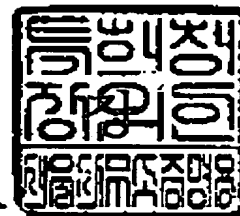
출원인 : 대한민국(전남대학교총장)
Applicant(s) CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY

2009년 12월 18일



특허청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any forgery or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPOnet- Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage (www.kipo.go.kr). But please notice that the confirmation by the issue number is available only for 90 days.



출원번호: 10-2004-0001974

【서지사항】

【서류명】 명세서 등 보정서

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2004.01.29

【제출인】

【명칭】 대한민국(전남대학교총장)

【출원인코드】 2-1999-901983-7

【사건과의 관계】 출원인

【대리인】

【성명】 윤동열

【대리인코드】 9-1998-000307-3

【대리인】

【성명】 박종한

【대리인코드】 9-2003-000119-5

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0001974

【출원일자】 2004.01.12

【심사청구일자】 2004.01.12

【발명의 명칭】 비브리오 패혈증균 편모 구성인자 플라젤린을 유효성분으로
함 유하는 백신 보조제

【제출원인】

【접수번호】 1-1-2004-0011158-93

출원번호: 10-2004-0001974

【접수일자】 2004.01.12

【보정할 서류】 명세서등

【보정할 사항】

【보정대상항목】 별지와 같음

【보정방법】 별지와 같음

【보정내용】 별지와 같음

【취지】 특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같 이 제출합니다.

대리인

윤동열 (인)

대리인

박종한 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원

【첨부서류】 1.보정내용을 증명하는 서류_1통

【보정서】

【보정대상항목】 식별번호 14

【보정방법】 정정

【보정내용】

<14>

편모(flagella)는 세균의 운동성을 결정하는 중요한 구성요소이며 크게 후크(hook), 기저체(basal body), 필라멘트(filament)로 구성되어 있다. 편모는 세균의 유영(swimming) 혹은 유주운동(swarming motility), 세균의 주성(taxis)을 결정하고, 바이오필름을 형성하여, 병원성 미생물의 부착능을 결정하는 기능이 있다고 알려져 있다(McCarter, L. L., Microbiol Mol Biol Rev. 65:445-62, 2001; Kim, Y. K., McCarter, L. L., J Bacteriol. 182:3693-704, 2000; McCarter, L. L., J Bacteriol. 177:1595-609, 1995; Boles, B. R., McCarter, L. L. J Bacteriol. 182:1035-45, 2000; Prouty, M. G., Correa, N. E., Klose, K. E. Mol Microbiol. 2001 Mar;39(6):1595-609, 2001). 비브리오 패혈증균은 한 개의 극성 편모(polar flagellum)를 가지고 있다(McCarter, L. L., Microbiol Mol Biol Rev. 65:445-62, 2001). 편모의 필라멘트를 구성하는 구성 단위 단백질을 플라젤린이라 하며, 플라젤린이 규칙적으로 조합되어(assembling) 필라멘트를 형성한다. 최근 연구 결과에 의하면 포유류 Toll-like receptor-5(이하, "TLR-5"라 한다)가 그람 음성 및 그람 양성 세균의 플라젤린을 인지하여 NF- κ B를 활성화시킨다는 것이 알려져 있다(Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R.,

출원번호: 10-2004-0001974

Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A., Nature 410:1099-1103, 2001). TLR은 병원균과 관련된 분자 패턴(pathogen associated molecular pattern)을 인지하는 수용체로서 많은 감염체에 대항하는 첫 번째 선천적인 면역체계(innate immune system)의 주요 구성인자로 작동하며, 효과적 적응성 면역 반응(adaptive immune response)의 자극에도 관여하는 세포 수용체이다(Akira, S., Hemmi, H., Immunol. Lett. 85:85-95, 2003). 따라서, TLR 작동제(agonist)들이 여러 가지 백신의 보조제 개발의 표적이 될 수 있다.

【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2004.01.12
【발명의 국문명칭】 비브리오 패혈증균 편모 구성인자 플라젤린을 유효성분으로 함유하는 백신 보조제
【발명의 영문명칭】 Vaccine adjuvants containing constituents of the flagellum of *Vibrio vulnificus* as an active component
【출원인】
【명칭】 대한민국(전남대학교총장)
【출원인코드】 2-1999-901983-7
【대리인】
【성명】 윤동열
【대리인코드】 9-1998-000307-3
【대리인】
【성명】 박종한
【대리인코드】 9-2003-000119-5
【발명자】
【성명의 국문표기】 이준행
【성명의 영문표기】 RHEE, Joon Haeng

출원번호: 10-2004-0001974

【주민등록번호】 600326-1XXXXXX

【우편번호】 500-767

【주소】 광주광역시 북구 두암동 100 현대아파트 101동 1101호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이시은

【성명의 영문표기】 LEE, Shee Eun

【주민등록번호】 680130-2XXXXXX

【우편번호】 500-101

【주소】 광주광역시 북구 두암1동 현대아파트 2차 201동 1106호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김수영

【성명의 영문표기】 KIM, Soo Young

【주민등록번호】 701015-2XXXXXX

【우편번호】 502-241

【주소】 광주광역시 서구 화정1동 594-5

【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 16

【서열목록의 전자문서】 첨부

출원번호: 10-2004-0001974

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원; 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다.

대리인

윤동열 (인)

대리인

박종한 (인)

【수수료】

【기본출원료】 27 면 38,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 5 항 269,000 원

【합계】 307,000 원

【면제사유】 국가

【면제후 수수료】 0 원

【첨부서류】 1. 위임장_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 *flaA*, *flaB*, *flaF*, *flaC*, *flaD* 및 *flaE* 유전자에 의해 인코딩되는 비브리오 패혈증균(*Vibrio vulnificus*)의 편모구성인자 플라젤린 및 이를 유효성분으로 함유하는 백신 보조제(vaccine adjuvant)에 관한 것이다.

【대표도】

도 8

【색인어】

비브리오 패혈증균, 플라젤린, 백신 보조제, 백신, Toll like receptor-5

【명세서】

【발명의 명칭】

비브리오 패혈증균 편모 구성인자 플라젤린을 유효성분으로 함유하는 백신 보조제{Vaccine adjuvants containing constituents of the flagellum of *Vibrio vulnificus* as an active component}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 비브리오 패혈증균의 플라젤린 유전자 2가지 오페론 구조 중 locus 1을 보여준다.
- <2> 도 2는 비브리오 패혈증균의 플라젤린 유전자 2가지 오페론 구조 중 locus 2를 보여준다.
- <3> 도 3은 재조합 FlaB를 상피세포에 처리하였을 때 상피세포로부터 농도 의존적으로 인터루킨-8이 분비되는 것을 보여준다.
- <4> 도 4는 재조합 FlaB를 사람 TLR-5와 인터루킨-8 전사 리포터를 발현하는 세포에 처리하였을 때 인터루킨-8의 전사활성을 보여준다.
- <5> 도 5는 패혈증 비브리오균 편모구성인자 6가지 플라젤린에 대한 글루타치온-S-트랜스퍼레이스 융합 단백을 사람 TLR-5와 인터루킨-8 전사 리포터를 발현하는 세포에 처리하였을 때 인터루킨-8의 전사활성을 보여준다.
- <6> 도 6은 재조합 FlaB 및 재조합 FliC를 사람 수지상 세포에 처리하였을 때 수지상세포의 성숙을 유도하는 것을 보여준다.

출원번호: 10-2004-0001974

<7>

도 7은 재조합 FlaB를 테타누스 독소이드와 혼합하여 마우스의 비강에 면역한 마우스의 혈액 및 여러 가지 점막샘플을 채취하여 항원 특이적 면역 반응을 ELISA 방법으로 측정한 결과이다.

<8>

도 8은 재조합 FlaB를 테타누스 독소이드와 혼합하여 마우스의 비강에 면역한 후 테타누스 독소를 투여한 결과 치사량의 테타누스 독소로부터 숙주를 완벽히 보호하는 것을 보여주는 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<9>

본 발명은 *flaA*, *flaB*, *flaF*, *flaC*, *flaD* 및 *flaE* 유전자에 의해 인코딩되는 비브리오 패혈증균(*Vibrio vulnificus*)의 편모 구성인자 플라젤린 및 이를 유효성분으로 함유하는 백신 보조제(vaccine adjuvant)에 관한 것이다.

<10>

비브리오 패혈증균 감염증은 역사가 비교적 짧으나 전 세계적으로 임상증례가 계속 보고 되고 있으며 새로이 주목받고 있는 질환중의 하나이다. 비록 전 세계적으로 절대적인 발병률은 콜레라나 살모넬라 식중독보다 적지만 높은 치명율과 비극적인 임상증상 때문에 심각한 사회적 문제를 야기하고 있다.

<11>

비브리오 패혈증균은 1976년 미국 질병통제센터(Centers for Disease Control; 이하 CDC로 약함)의 홀리스(Hollis)등이 11년 동안 사람에서 분리된 호염성, 병원성 비브리오 균의 세균학적 성상을 처음 보고한 이후, 유당(lactose)을 분

출원번호: 10-2004-0001974

해하는 특징 때문에 유당 분해 비브리오(lactose-fermenting *Vibrio* 또는 Lac(+))라 명명되었다. 1979년 CDC의 블레이크(Blake)등은 CDC에 보고된 39명의 환자의 자료를 역학적으로 분석하여 임상증상에 따라 원발성 패혈증(primary septicemia)군과 창상감염(wound infection)군으로 분류하였다 (Blake, P.A., Merson, M.H., Weaver, R.E., Hollis, D.G., Heublein, P.C., *N. Engl. J. Med.* 300:1-6, 1979). 같은 해 파머 (Farmer)는 새로운 종으로서 *Vibrio vulnificus*(vulnus=wound, ficus=forming)라 명명하였으며, 오늘에 이르고 있다(Farmer, J.J. III, *Lancet* 2:903, 1979).

<12>

V. vulnificus 패혈증은 잠복기가 짧고, 일단 발병하면 전격적으로 진행하여 효과적 항균제 치료 타이밍을 놓치기 쉽다. *V. vulnificus* 패혈증은 대부분 40대 이상(약 90-95%)의 남자(90% 이상)에서 발생하며, 정상인에서는 거의 볼 수 없고, 기저질환을 가지고 있는 환자들에서 주로 발병한다. 전 세계의 발생증례를 분석해보면 원발성 패혈증의 경우, 대부분의 환자들은 간장 질환과 음주벽 등 만성질환을 가지고 있으며, 간장 질환으로서는 간경변, 만성간염, 간암 등이 주종을 이루고, 그 외 당뇨병, 폐결핵, 만성골수염, 류마티스성 관절염 등의 기저질환이 확인되었다. 그러나 5% 이하에서는 특별한 기저질환을 찾을 수 없는 경우도 있다. 미국의 경우 당뇨병, 악성종양, 혈색소증(hemochromatosis), 지중해빈혈(thalassemia) 등의 빈도가 비교적 높게 나타난다. 최근에는 AIDS 환자들에서 *V. vulnificus* 패혈증의 발생보고가 나오고 있어, 미국 CDC에서는 AIDS 환자들에게 여름철에는 굴 등의 해산물을 생식하지 말 것을 권고하고 있다.

<13>

*V. vulnificus*에 의한 발병 기전에 관한 연구는 1980년 중반부터 본격적으로 시작되었다. 초기에는 주로 다른 비브리오 속들과는 달리 *V. vulnificus*가 패혈증을 잘 일으키는 이유와 원발성 패혈증이 주로 간장 질환이 있는 환자들에서 발생하는 이유를 구명하기 위한 연구가 진행되었다. 그 결과를 살펴보면, 어패류를 통해 섭취되어 장관에 이른 *V. vulnificus*는 장관 내 점액질을 통과하여 장관 상피세포에 부착한 다음, 장관 상피세포를 파괴하고 장관 점막층으로 침입하여 혈관으로 들어가는 것으로 생각되고 있다. 간장 질환 등의 기저질환을 가지고 있는 감수성이 높은 환자들의 혈류로 들어간 *V. vulnificus*는 활발하게 증식하고, 패혈증을 일으킨다(Linkous, D.A., Oliver, J.D., *FEMS Microbiol. Lett.* 174:207-214, 1999).

<14>

편모(flagella)는 세균의 운동성을 결정하는 중요한 구성요소이며 크게 후크(hook), 기저체(basal body), 필라멘트(filament)로 구성되어 있다. 편모는 세균의 수영(swimming) 혹은 유주운동(swarming motility), 세균의 주성(taxis)을 결정하고, 바이오필름을 형성하여, 병원성 미생물의 부착능을 결정하는 기능이 있다고 알려져 있다(McCarter, L. L., *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:445-62, 2001; Kim, Y. K., McCarter, L. L., *J Bacteriol.* 182:3693-704, 2000; McCarter, L. L., *J Bacteriol.* 177:1595-609, 1995; Boles, B. R., McCarter, L. L. *J Bacteriol.* 182:1035-45, 2000; Prouty, M. G., Correa, N. E., Klose, K. E. *Mol Microbiol.* 2001 Mar;39(6):1595-609, 2001). 비브리오 패혈증균은 한 개의 극성 편모 (polar flagellum)을 가지고 있다(McCarter, L. L., *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:445-62, 2001). 편모의 필라멘트를 구성하는 구성 단위 단백질을 플라젤린이라 하며, 플라

출원번호: 10-2004-0001974

젤린이 규칙적으로 조합되어(assembling) 필라멘트를 형성한다. 최근 연구 결과에 의하면 포유류 Toll-like receptor-5(이하, "TLR-5"라 한다)가 그람 음성 및 그람 양성 세균의 플라젤린을 인지하여 NF- κ B를 활성화시킨다는 것이 알려져 있다 (Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Ha주, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A., Nature 410:1099-1103, 2001). TLR은 병원균과 관련된 분자 패턴(pathogen associated molecular pattern)을 인지하는 수용체로서 많은 감염체에 대항하는 첫 번째 선천적인 면역체계 (innate immune system)의 주요 구성인자로 작동하며, 효과적 적응성 면역 반응 (adaptive immune response)의 자극에도 관여하는 세포 수용체이다(Akira, S., Hemmi, H., Immunol. Lett. 85:85-95, 2003). 따라서, TLR 작동제(agonist)들이 여러 가지 백신의 보조제 개발의 표적이 될 수 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<15>

이에 본 발명자들은 TLR-5의 작동제인 비브리오 패혈증균의 플라젤린이 상피 세포로부터 인터루킨-8 생산을 자극하였으며, 사람 수지상 세포를 성숙 (maturation)시키고, 테타누스 독소이드와 혼합하여 마우스의 비강에 3차에 걸쳐 면역한 경우 테타누스 독소에 반응하는 점막내 IgA 수치가 테타누스 독소이드만을 투여한 그룹에 비해 현저히 증가하였으며, 치사량의 테타누스 독소로부터 마우스를 완벽하게 보호하는 것을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

<16> 따라서, 본 발명의 목적은 패혈증 비브리오균의 편모구성인자인 플라젤린을 유효성분으로 함유하는 감염질환, 항암 및 피임 백신 등의 각종 유효백신 개발에 필요한 백신 보조제(vaccine adjuvant)를 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

<17> 본 발명자들의 연구 결과에 의하면 패혈증 비브리오균의 편모를 구성하는 유전자는 DNA 서열 1 또는 아미노산 서열 2로 표시되는 *flaA*, DNA 서열 3 또는 아미노산 서열 4로 표시되는 *flaB*, DNA 서열 5 또는 아미노산 서열 6으로 표시되는 *flaF*, DNA 서열 7 또는 아미노산 서열 8로 표시되는 *flaC*, DNA 서열 9 또는 아미노산 서열 10으로 표시되는 *flaD* 및 DNA 서열 11 또는 아미노산 서열 12로 표시되는 *flaE* 으로 구성되어 있으며, 각각의 유전자 구성은 *Vibrio parahaemolyticus* 균과 유사하며 상동성도 높다.

<18> 본 발명에 의한 패혈증 비브리오균 플라젤린 구성인자인 Fla가 백신 보조제 효과를 증명하는 과정은 다음과 같다:

- <19> 1) 재조합 Fla를 제조 분리하는 단계;
- <20> 2) 재조합 Fla가 상피세포로부터 인터루킨-8 생산 촉진을 확인하는 단계;
- <21> 3) 재조합 Fla가 사람 수지상 세포의 성숙 유도를 관찰하는 단계;
- <22> 4) 재조합 Fla를 테타누스 독소이드와 혼합하여 비강내 면역 후 항원 특이적 면역반응을 측정하는 단계; 및

출원번호: 10-2004-0001974

- <23> 5) 재조합 Fla를 테타누스 독소이드와 혼합하여 비강내 면역 후 마우스에서 테타누스 독소에 대한 숙주 방어능력을 측정하는 단계;
- <24> 를 포함한다.
- <25> 따라서, 본 발명은 비브리오 패혈증균(*Vibrio vulnificus*)의 편모구성인자인 FlaA, FlaB, FlaF, FlaC, FlaD 및 FlaE를 유효성분으로 함유하는 백신 보조제에 관한 것이다.
- <26> 또한 본 발명은 비브리오 패혈증균(*Vibrio vulnificus*)의 플라젤린 구성 유전자 중 N-말단과 C-말단 사이에 존재하는 일부분의 염기 서열을 기타 면역 에피토프(immunogen epitope)를 인코딩하는 유전자로 치환하여, 플라젤린에 의해 유도된 보조활성(adjuvanticity)이 있는 재조합 면역원을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- <27> 보다 상세하게는 서열번호 1 내지 12의 비브리오 패혈증균(*Vibrio vulnificus*)의 플라젤린 구성 유전자 중 1-191 아미노산에 해당하는 FlaA, 1-191 아미노산에 해당하는 FlaB, 1-191에 해당하는 FlaF, 1-191에 해당하는 FlaC, 1-191에 해당하는 FlaD, 1-189에 해당하는 FlaE의 N-말단 부분; 및
- <28> 277-376 아미노산에 해당하는 FlaA, 278-377 아미노산에 해당하는 FlaB, 278-377에 해당하는 FlaF, 285-385에 해당하는 FlaC, 278-377에 해당하는 FlaD, 276-375에 해당하는 FlaE의 C-말단 사이에 존재하는 부분;
- <29> 의 염기 서열을 단백질항원 에피토프를 인코딩하는 유전자로 치환하여, 플라젤

출원번호: 10-2004-0001974

린에 의해 유도되는 보조활성(adjuvanticity)을 가지는 재조합 면역원을 제조할 수 있다.

<30> 본 발명에서 사용하는 단백항원 에피토프를 인코딩하는 유전자로는 테타누스 독소이드, 인플루엔자 바이러스 면역원성 에피토프, PspA, 정자(sperm)에 선택적인 항원 등을 인코딩하는 유전자를 들 수 있다.

<31> 본 발명에 의한 백신 보조제는 오일 또는 수성매질에서 용액, 현탁액 또는 유화액의 형태가 되거나, 사용하기 전에 무균 상태의, 발열물질이 제거된 물로 녹여 사용하는 건조분말의 형태 등의 경구용 제형으로 제형화할 수도 있고, 피하주사, 정맥주사 또는 근육주사 등의 비경구형 제형으로 제형화할 수도 있다.

<32> 경구용 제형의 경우는 약제학적으로 허용 가능한 담체(carrier) 또는 부형제(forming agent)를 이용하여 공지의 방법으로, 예를 들면, 정제, 트로키제, 함당정제, 수성 또는 유성 현탁액, 분산 가능한 가루 혹은 입자, 유화액, 연질 혹은 경질 캡슐, 시럽, 일릭서와 같은 형태의 경구형 제형으로 제제화할 수 있으며, 이는 단위 투여량, 형태 등에 따라 알맞게 제조할 수 있다.

<33> 비경구형 제형은 멸균된 주사 가능 용액 혹은 무독성의 사용 가능한 희석제(diluent)나 1,3-부탄디올 등의 용매에 활성성분을 현탁시킨 현탁액으로 제제화하여 주사할 수 있다. 사용 가능한 부형제나 용매로는 물, 링거액 그리고 등장성 식염수 용액이 있으며, 에탄올, 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜 같은 공용매

출원번호: 10-2004-0001974

를 사용할 수 있다. 또한, 멸균된 비휘발성 오일을 관습적으로 용매 혹은 현탁 용매로 사용할 수 있다. 좌제 형태는 약물을 상온에서는 고체였다가 직장내의 온도에서는 액체가 되어 직장 내에서 녹아 약물을 방출하게 하는 적절한 무자극성 부형제, 예를 들면, 코코아버터 또는 폴리에틸렌글리콜 등과 혼합하여, 제제화한 후, 직장에 투여한다.

<34> 본 발명에 의한 백신 보조제의 구체적인 예로는 테타누스 등의 항독소 백신; 콜레라, 장티프스 등 생균 및 사균 백신; 인플루엔자, 사스(SARS) 등 항바이러스 백신; 자궁 경부암 등에 대한 항암 백신; 항정자 피임 백신; 및 단백질 또는 펩티드 등의 제조합 백신에 대한 보조제를 들 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

<35> 또한 본 발명은 비브리오 패혈증균의 플라젤린에만 국한되는 것이 아니며, 이와 유사한 플라젤린 유전자로 인코딩되는 플라젤린 단백질을 가지는 편모균들에서도 동일하게 적용할 수 있을 것이다.

<36> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 더 구체적으로 설명하지만, 본 발명이 이들 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

<37> 본 발명에서 사용하는 균주 및 플라스미드의 특성은 표 1에 정리하였다. 각각의 제조 방법과 자세한 특성은 해당 실시예 및 시험예에서 적시하였다.

출원번호: 10-2004-0001974

【표 1】

<38>

균주 혹은 플라스미드	특 징	출 처
<i>V. vulnificus</i>		
CMCP6	Clinical isolate, highly virulent	발명자
ATCC29307	Type strain	ATCC로부터 구입
<i>Escherichia coli</i>		
ER2566	F- λ - <i>fhuA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompTlacZ::T7 geneIgal</i> <i>sulAI1(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]</i>	New England Biolab
<i>Plasmids</i>		
pTYB	IMPACT (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) expression vector, AmpR, 7,417 bp	New England Biolab

<39>

< 각 균주의 배양 및 보관 >

<40>

하기 실시예 및 시험예에서 사용한 대장균 균주들은 Luria Bertani 배지(Difco Co.)에서, 비브리오 패혈증균은 heart infusion 배지(Difco Co.)에서 배양하였다. 사용한 균주들은 배양 후 글리세롤을 50% 되게 첨가하여 -80℃ 초저온 냉동고에서 보관하였다.

<41>

[실시예 1] 트랜스포존 라이브러리(transposon library) 제조

<42>

V. vulnificus M06-24/0 표준균주(미국 University of Maryland School of Medicine, Division of Hospital Epidemiology의 J. Glenn Morris로부터 획득)와 mini-Tn5 *lacZ*1을 포함하고 있는 *E. coli* SM10 *pir* 균주(독일 Braunschweig 소재

출원번호: 10-2004-0001974

GBF-National Research Center for Biotechnology의 Kenneth N. Timmis로부터 획득)의 단일 집락을 10ml의 2.5% NaCl heart infusion(이하, "2.5HI"라 한다) 액체배지와 20ml의 Luria Bertani(이하, "LB"라 한다, 암피실린 100 μ g/ml, 카나마이신 100 μ g/ml 함유) 액체배지에 각각 접종하여 37 $^{\circ}$ C, 210rpm에서 하룻밤 교반 배양하였다.

<43>

다음날 각각의 배양액을 원심한 후 항생제가 들어있지 않은 새로운 LB 액체배지로 두 번 원심세척한 뒤 각각 100 μ l의 새로운 LB 액체배지에 부유시켰다. 그리고 *E. coli* 와 *V. vulnificus* 균액을 서로 혼합하여 LB 한천배지 위에 떨어뜨렸다. 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양한 후 LB 한천배지 상에 자란 세균집락에 새로운 2.5HI 액체배지 800 μ l를 떨어뜨린 후 멸균된 유리봉을 이용하여 잘 긁어내었다. 이 균액을 1.5ml 플라스틱 시험관으로 옮긴 뒤 충분히 교반하여 균질하게 부유되도록 하였다. 이 균액을 카나마이신(kanamycin) 200 μ g/ml을 함유한 TCBS(thiosulfate citrate bile sucrose) 한천배지에 원액, 1/10, 1/100 희석액 100 μ l씩을 각각 떨어뜨린 후 완전히 스며들도록 잘 도말한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 배양하였다.

<44>

다음날 TCBS 한천배지 상에 자란 비브리오 집락만을 이쑤시개를 이용하여 카나마이신 300 μ g/ml을 함유한 TCBS 한천배지에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음날 형성된 비브리오 집락을 200 μ g/ml의 카나마이신을 함유한 100 μ l의 2.5HI 액체배지가 담긴 96-well 배양판의 각 well에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 정체 배양한다. 다음날 균이 자란 각 well에 80 μ l의 50% 글리세롤(in 2.5 HI)을 가한 뒤 -80 $^{\circ}$ C 초저온냉동기에 보관하다가 필요시 레플리카 플레이터(replica plater)를

출원번호: 10-2004-0001974

사용하여 2.5HI 한천배지에 접종하여 배양한 후 각 실험에 사용하였다.

<45> [실시예 2] 운동성 상실 트랜스포존 돌연변이 클론의 스크리닝

<46> 실시예 1과 같이 제조된 *V. vulnificus* M06-24/0 균주의 트랜스포존 라이브러리 각 균주 클론들을 2.5HI 액체배지에서 하룻저녁 배양한 후 0.3% 한천 함유 반고형 heart infusion 한천배지에 멸균된 이쭉시개를 이용하여 균을 접종하고 약 6시간 동안 37℃에서 배양 한 후 균이 증식하여 움직인 범위를 측정하여 운동성의 정도를 판단하였다.

<47> 몇 차례의 스크리닝 과정을 통하여 운동성이 거의 상실된 3개의 트랜스포존 돌연변이 클론들을 선발하여 트랜스포존이 삽입되어 돌연변이가 초래된 유전자를 동정하는 실험을 진행하였다.

<48> [실시예 3] 플라젤린 오페론 유전자의 동정

<49> 트랜스포존이 삽입된 주위 유전자들의 클로닝은 arbitrary PCR법을 사용하여 증폭한 DNA 조각을 표지자로 사용하여 코스미드(cosmid) 유전체 라이브러리를 스크리닝하여 실시하였다. 트랜스포존 삽입 주위 DNA 조각들의 증폭은 two-step PCR 증폭 방법을 사용하였다. 첫 번째 PCR 반응에서는 서열번호 13의 임의의 프라이머 1(arbitrary primer 1; 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTCANNNNNNNNNNACGCCC-3')와 서열번호 14의 mini-Tn5 *lacZ*1 특이 프라이머 1(specific primer 1; 5'-

출원번호: 10-2004-0001974

TTCTTCACGAGGCAGACCTCAGCGC-3')을 사용하여 변성은 94℃에서 30초, 어닐링 30℃에서 30초, 확장 72℃에서 1분 30초 조건으로 5 사이클 PCR 반응을 실시한 후 다시 94℃에서 30초, 45℃에서 30초, 72℃에서 2분간 반응하는 PCR 반응을 30 사이클 실시하여 1차 PCR 반응을 실시하였다. 1차 PCR 반응산물을 주형으로 하여 2차 PCR 반응을 실시하였다. 2차 PCR 반응에서는 서열번호 15의 임의의 프라이머 2(5'-GGCCAAGAGTCGACTAGTCA-3')와 서열번호 16의 또다른 mini-Tn5 *lacZ*I 특이 프라이머 2(5'-CCGCACTTGTGTATAAGAGTCAG-3')를 이용하였으며, 변성은 94℃에서 30초, 어닐링 55℃에서 30초, 확장 72℃에서 1분 30초 반응 조건으로 30 사이클 반응을 실시하였다. 이 PCR 산물을 아가로오스(agarose) 전기영동한 후 겔에서 증폭 DNA 부위를 분리하여 염기서열 결정에 사용하였다. Arbitrary PCR 결과 3 특이적인 DNA 조각이 증폭되었다.

<50> 증폭 DNA 조각의 염기서열을 결정해 미국 National Center for Biological Information의 GenBank 데이터베이스에 수록되어 있는 유전자들과 BLAST 분석을 실시해본 결과, 장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)의 *bcr*, *cheR*, *flgG* 유전자와 상동성(identity)을 나타내었다. 본 발명자들에 의해 완전 해독한 패혈증 비브리오균 계놈 유전자 서열을 분석한 결과 상기의 유전자들은 극성 편모 플라젤린 오페론에 위치하고 있었으며, 이를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

<51> [실시예 4] 재조합 플라젤린의 제조 및 분리

<52> *flaB* 유전자의 ORF을 함유하고 있는 1.5 kb의 *EcoRI*과 *PstI* 조각을 인테인

출원번호: 10-2004-0001974

(intein) 융합 발현 벡터인 pTYB12(New England Biolabs Inc.)에 클로닝하여 pCMM0031 플라스미드를 제조하였다. 이 플라스미드를 ER2566 대장균에 일렉트로포레이션 방법으로 넣어 주고 5-브로모-인돌-3-클로로-이소프로필-b-D-갈락토피라노시드(IPTG) 0.5mM을 가하여 발현을 유도하였다. 제조사(New England Biolabs Inc.)의 지침에 따라 키틴 비드 칼럼과 1,4-디티오프레이톨(1,4-DTT)을 이용하여 인테인 융합 단백질로부터 FlaB 단백질만을 분리 정제하였다. 분리된 FlaB 단백질 중에 함유되어 있는 엔도톡신(endotoxin)은 AffinityPakTM Detoxi GelTM Endotoxin Removing gel(Pierce 사)을 이용하여 제거하여 사용하였다.

<53> 상기와 같은 방법으로 *flaA*, *flaB*, *flaF*, *flaC*, *flaD*, *flaE* 각 유전자의 ORF(open reading frame)을 pGEX4T-1 벡터에 클로닝하여 제조사(Amersham Pharmacia)의 지침에 따라 글루타치온-S-트랜스퍼레이스 융합 단백질을 분리하였다.

<54> [시험예 1] 상피세포에 대한 FlaB 의 반응 효과

<55> 24-well 평판 배양기에 Caco-2 세포를 2.0×10^5 세포씩 분주하여 10% 우태혈청을 가한 DMEM 배지에서 하룻저녁 배양하였다. 그 후 우태혈청을 첨가하지 않은 DMEM 배지로 2차례 세척하고, 분리한 재조합 FlaB를 농도별로 처리하여 3시간 동안 배양한 후에 상청액에 유리된 인터루킨-8을 ELISA kit(R&D systems Co.)로 측정하여 비교하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 상기 도 3의 결과는 재조합 FlaB

출원번호: 10-2004-0001974

가 Caco-2 세포의 표면에 존재하는 수용체에 작용하여 세포내에 신호를 전달함으로써 염증 반응의 중요 매개인자를 분비하는 세포인 호중구(neutrophil)를 보강하는 것으로 알려진 인터루킨-8의 분비를 농도의존적으로 촉진하는 것을 보여준다.

<56> [시험예 2] TLR-5 매개에 의한 플라젤린의 인터루킨-8 전사 조절

<57> 24-well 평판 배양기에 Caco-2 세포를 2.0×10^5 세포씩 분주하여 하룻저녁 배양한 후 Eugene(Roche 사)을 이용하여 IL-8-Luc 플라스미드(한양대학교 의과대학 미생물학 교실의 김정목 교수로부터 획득)와 TLR-5 유전자가 클로닝된 p3xFlag-hTLR5 플라스미드(미국 Wake Forest University School of Medicine, Departments of Microbiology and Immunology의 Steven B. Mizel로부터 획득) 및 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase) 발현 대조군 플라스미드(Clontech 사)를 Eugene(Roche 사)을 이용해 동시에 세포내로 도입시켰다. 24시간 추가 배양 후 새로운 배지를 교체하고, 재조합 FlaB 와 FlaA, FlaB, FlaF, FlaC, FlaD 및 FlaE에 대한 글루타치온-S-트랜스퍼레이스 융합단백질을 일정 시간 처리한 후 루시퍼라아제(luciferase) 활성을 측정하여 인터루킨-8 전사정도를 발광분석기(luminometer, Berthold사)를 이용해 측정하였으며 그 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

<58> 재조합 FlaB는 농도 의존적으로 인터루킨-8의 전사를 활성화하였으며, 다른 패혈증 비브리오균 편모구성 플라젤린인 FlaA, FlaF, FlaC, FlaD, FlaD 및 FlaE도 정도의 차이는 있으나 공히 인터루킨-8 전사활성을 나타내었다.

<59> [시험예 3] 사람 말초 혈액 유래 수지상 세포에 대한 재조합 FlkB 의 반응 효과

<60> 사람 말초혈액에서 피콜(Ficoll Paque PLUS; Amersham 사)을 이용한 원심분리방법으로 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell; 이하 "PBMC"라 한다)를 분리하였다. 말초혈액 단핵세포 중에서 골수성 세포(myeloid)에 선택적으로 발현하는 CD14를 인지하는 자기 비드(magnetic bead)를 6-12℃에서 20분간 반응시키고 자기세포 분리기(magnetic cell sorter)를 이용하여 CD14 양성 세포를 분리하였다. CD14 양성세포를 10% 우태혈청을 가한 RPMI배지에 50ng/ml GM-CSF 와 50ng/ml IL-4를 첨가하여 6일 동안 배양하여 미성숙 수지상세포로 분화시킨 후 실시예 4에서 제조한 재조합 FlkB 및 실시예 4와 동일한 방법으로 제조한 살모넬라균의 플라젤린 FliC를 각각 6nM 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하여 재조합 FlkB 및 FliC가 사람 수지상 세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하였다. FliC를 시험한 이유는 본 발명이 다른 세균의 플라젤린의 특성을 포괄할 수 있는지, 다시 말해 범용성이 있는지를 시험하기 위해서 이다.

<61> 수지상세포 표면에 선택적으로 발현하는 CD1a, HLA-DR, CD80, CD83 및 CD86를 각각 인식하고 FITC(fluorescein isothiocyanate) 혹은 홍조소(phycoerythrin)가 결합된 단클론 항체를 반응시켜 양성 시그널을 보이는 세포 그룹을 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 발현 정도를 측정하였으며, 그 결과를 하기 도 6에 나타내었다.

출원번호: 10-2004-0001974

<62>

사람 수지상 세포에 패혈증 비브리오균 유래 재조합 FlaB를 처리한 경우, 수지상 세포의 성숙도를 표시하는 CD1a, CD80, CD83, CD86 양성 세포군 백분율 값이 각각 87.52%, 67.3%, 23.57%, 43.29%로 FlaB를 처리하지 않은 대조군의 CD1a, CD80, CD83 및 CD86 양성세포군의 각각의 백분율 값 36.12, 15.29%, 0.82%, 1.5%에 비해 현저히 증가한 것을 관찰할 수 있었으며, HLA-DR은 대조군과 공히 95% 이상의 발현을 보이지만 발현정도가 높은 세포군이 더 많음을 관찰할 수 있었다. 반면 골수계 세포(myeloid)에 선택적으로 발현하는 CD14는 수지상 세포로 분화될수록 발현이 감소하였다. 살모넬라 유래 플라젤린 FliC도 FlaB와 유사한 효과를 나타내었다.

<63>

[시험예 4] 재조합 FlaB의 점액성 면역 보조제(mucosal immune adjuvant) 효능 검사

<64>

SPF(specific pathogen free) 5주령 Balb/c 마우스의 비강내로 PBS (phosphate buffered saline), 5 μ g 테타누스 독소이드 및 5 μ g 테타누스 독소이드와 50 μ g FlaB 혼합물을 1주일 간격으로 3회에 걸쳐 면역시키고 마지막으로 면역한 날로부터 1주일 후에 마우스의 혈청, 침(saliva), 질세척액(vaginal wash), 분변(feces)을 채취한 후 테타누스 독소이드-특이적 전신 면역 반응(systemic immune response)과 점액성 면역반응(mucosal immune response)을 ELISA(Enzyme linked immuno sorbant assay) 방법으로 측정하였으며, 3회에 걸쳐 예방 접종한 마우스에 최소 치사량의 300배 혹은 200배에 해당하는 테타누스 독소를 전신으로 투여하여 7일 동안 마우스의 생존을 관찰하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에서

출원번호: 10-2004-0001974

알 수 있듯이, PBS만을 투여한 대조군이나 테타누스 독소이드 만을 투여한 마우스(TT)에서보다 테타누스 독소이드와 FlaB를 혼합 투여한 마우스(TT + FlaB)에서 항원 특이적 전신 면역 및 점액성 면역 반응이 높게 나타났다.

<65>

또한 3회에 걸쳐 예방 접종한 마우스에 최소 치사량의 300배 혹은 200배에 해당하는 테타누스 독소를 전신으로 투여하고 7일 동안 마우스의 생존을 관찰하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다. PBS 만으로 면역한 대조군 마우스는 24시간 내에 100%가 사망하였고, 테타누스 독소이드만을 비강으로 투여한 마우스(TT)에서는 40~60% 의 마우스만이 생존하였으나, 테타누스 독소이드와 FlaB를 혼합 투여한 마우스(TT + FlaB)에서는 100% 마우스가 생존하였으며, 테타누스 독소이드만을 투여한 마우스의 경우 생존한 마우스도 전형적인 강직성 마비 현상을 보였지만 테타누스 독소이드와 FlaB를 혼합 투여한 마우스의 경우 정상 마우스와 동일한 외형을 나타내었다.

<66>

상기 도 7 및 도 8의 결과로 재조합 FlaB가 효과적 백신 보조제(vaccine adjuvant) 역할을 할 수 있음을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

<67>

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의한 패혈증 비브리오균의 플라젤린을 구성하는 FlaA, FlaB, FlaF, FlaC, FlaD 및 FlaE는 상피세포에서 인터루킨-8의 생산을 자극하고, 수지상 세포의 성숙을 촉진하며, 백신으로 사용하는 면역자극제

출원번호: 10-2004-0001974

에 대한 숙주의 항원-특이적 면역 반응을 증가시켰다.

<68>

또한 본 발명에 의한 상기 플라젤린 구성 단백질을 테타누스 독소이드와 혼합하여 마우스의 비강에 면역하고 테타누스 독소를 투여한 결과 점액조직에서 항원에 대한 IgA 수치가 플라젤린을 보조제로 첨가하지 않은 대조군에 비해 현저히 높았으며 치사량의 테타누스 독소로부터 숙주를 완벽히 보호하였다. 특히 질 세척액 내에서 IgA 수치가 월등히 높은 점으로 보아 정자를 선택적으로 작용하는 피임 백신 개발 시 보조제로서 응용 가능 할 것으로 생각된다.

<69>

본 발명에 의한 재조합 플라젤린 단백질은 다양한 감염 질환 및 항암 치료를 위한 효과적인 백신 보조제로 사용할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

DNA 서열 1 또는 아미노산 서열 2로 표시되는 *flaA*,

DNA 서열 3 또는 아미노산 서열 4로 표시되는 *flaB*,

DNA 서열 5 또는 아미노산 서열 6으로 표시되는 *flaF*,

DNA 서열 7 또는 아미노산 서열 8로 표시되는 *flaC*,

DNA 서열 9 또는 아미노산 서열 10으로 표시되는 *flaD* 및

DNA 서열 11 또는 아미노산 서열 12로 표시되는 *flaE* 유전자

로 인코딩되는 비브리오 패혈증균(*Vibrio vulnificus*)의 플라젤린 단백질 중
에서 선택된 하나 이상의 구성인자 단백질을 유효성분으로 함유시킨 백신 보조제.

【청구항 2】

서열번호 1 내지 12의 비브리오 패혈증균(*Vibrio vulnificus*)의 플라젤린 구성 유전자 중 1-191 아미노산에 해당하는 FlaA, 1-191 아미노산에 해당하는 FlaB, 1-191에 해당하는 FlaF, 1-191에 해당하는 FlaC, 1-191에 해당하는 FlaD, 1-189에 해당하는 FlaE 의 N-말단 부분; 및

277-376 아미노산에 해당하는 FlaA, 278-377 아미노산에 해당하는 FlaB, 278-377에 해당하는 FlaF, 285-385에 해당하는 FlaC, 278-377에 해당하는 FlaD, 276-375에 해당하는 FlaE의 C-말단 사이에 존재하는 부분;

의 염기 서열을 단백질항원 에피토프를 인코딩하는 유전자로 치환시킴으로써

출원번호: 10-2004-0001974

플라젤린에 의한 보조활성(adjuvanticity)을 가지도록 제조한 면역원의 제조방법.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 치환 단백항원 에피토프는 테타누스 독소이드, 인플루엔자 바이러스 면역원성 에피토프, 자궁경부암 유발 파필로마 바이러스 면역원성 에피토프, 폐렴구균 항원 PspA, 및 정자(sperm) 등 백신개발 대상이 되는 단백질 항원임을 특징으로 하는 면역원의 제조방법.

【청구항 4】

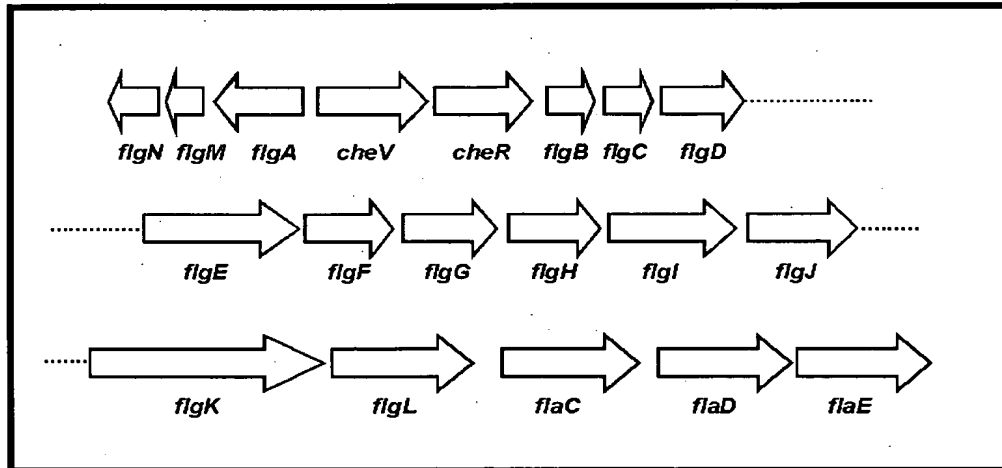
제 2항에 의한 방법으로 제조된 면역원을 유효성분으로 함유하는 백신 보조제.

【청구항 5】

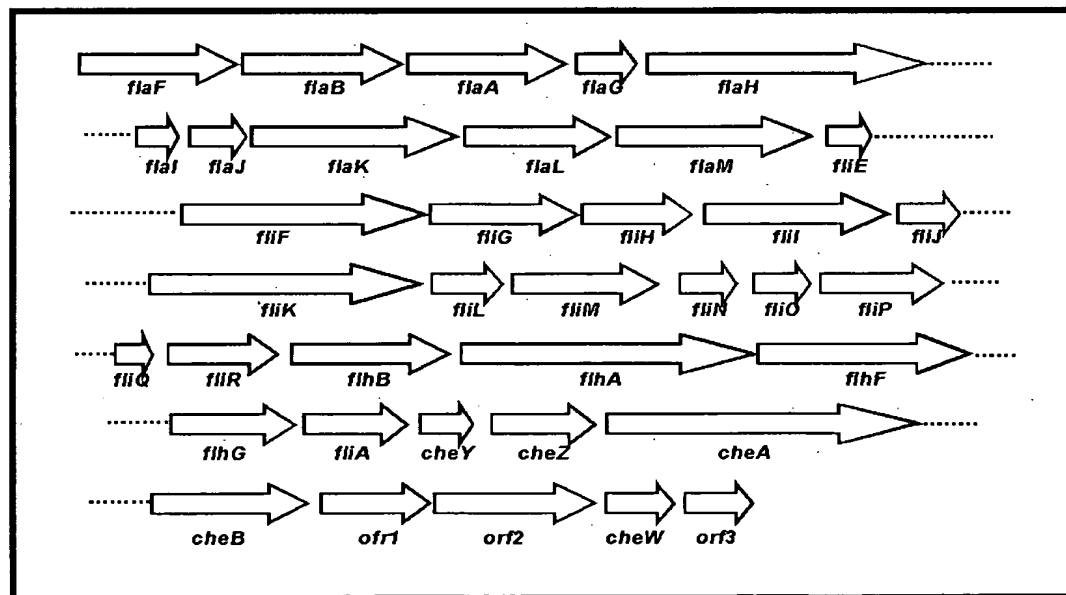
제 1항 또는 제 4항에 있어서, 상기 백신 보조제는 테타누스 등의 항독소 백신; 콜레라, 장티프스 등 생균 및 사균 백신; 인플루엔자, 사스(SARS) 등 항바이러스 백신; 자궁 경부암 등에 대한 항암 백신; 항정자 피임 백신; 및 단백질 또는 펩티드 등의 재조합 백신에 대한 보조제임을 특징으로 하는 백신 보조제.

【도면】

【도 1】

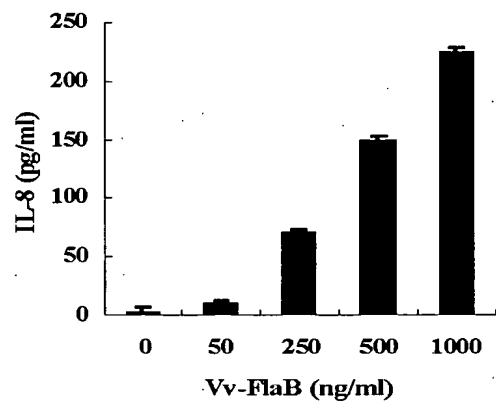


【도 2】

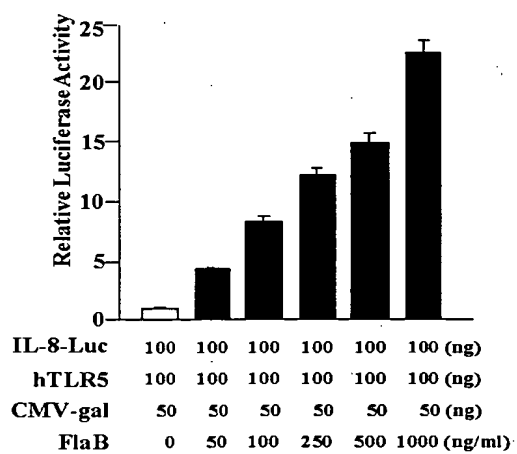


출원번호: 10-2004-0001974

【도 3】

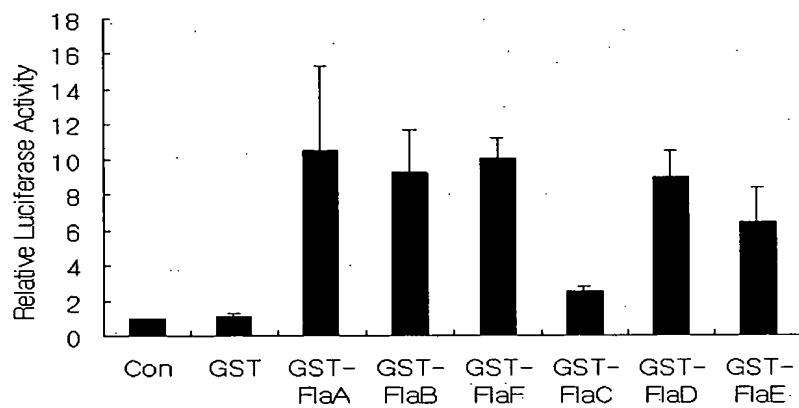


【도 4】



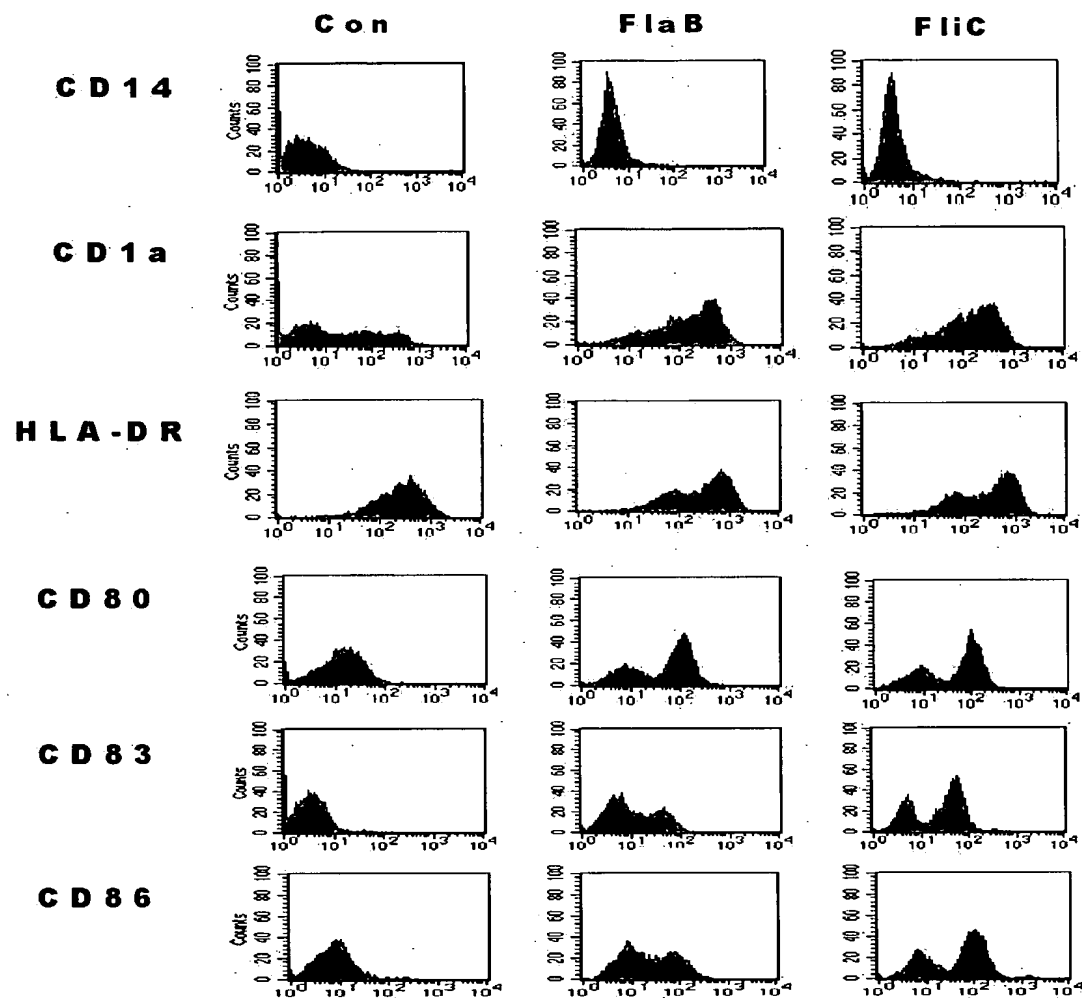
출원번호: 10-2004-0001974

【도 5】

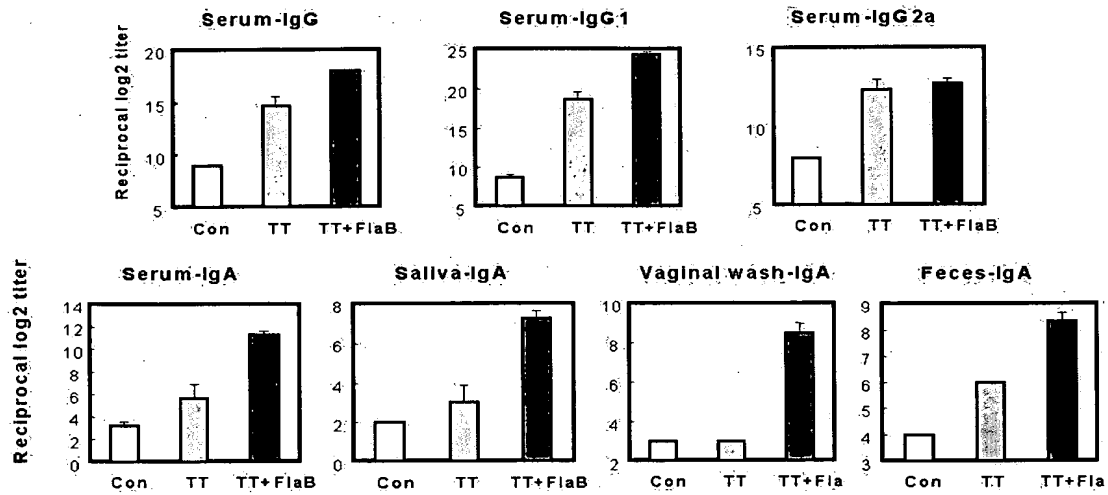


출원번호: 10-2004-0001974

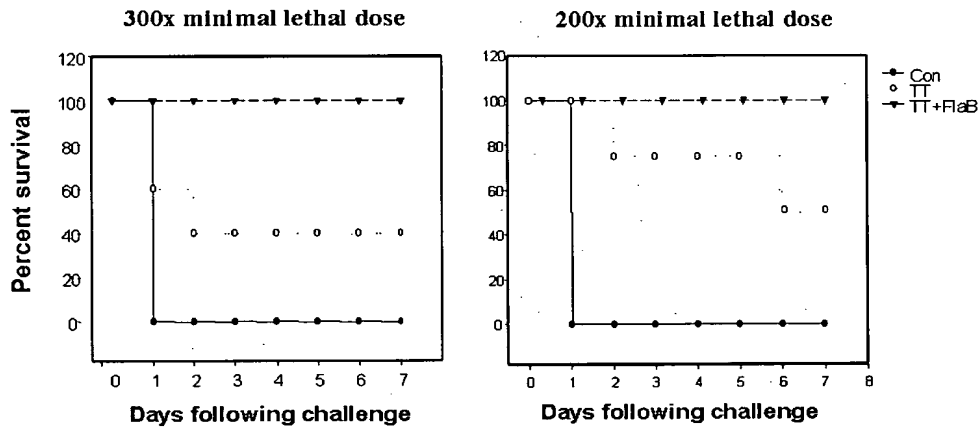
【도 6】



【도 7】



【도 8】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부